

氏 名	趙 磊
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	農 学
学位授与番号	博甲第 5 9 8 9 号
学位授与の日付	平成 3 1 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	環境生命科学研究科 農生命科学 専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)
学位論文の題目	Role of class III peroxidase PRX34 in plant oxidative burst and immunity (クラスⅢ型ペルオキシダーゼのオキシダティブバースト反応と免疫における役割)
論文審査委員	教授 加藤 鎌司 教授 豊田 和弘 教授 一瀬 勇規 准教授 能年 義輝
学位論文内容の要旨	
<p>This thesis is divided into four chapters: chapter I (general introduction), chapter II, chapter III and chapter IV. The chapter II, III and IV are further subdivided into five sections: abstract, introduction, material and methods, results and discussion.</p> <p>In general introduction, the current findings on molecular mechanisms of plant-pathogen interactions and the definition about pattern-triggered immunity (PTI), effector-triggered immunity (ETI), as well as the potential sources of ROS, such as a membrane-localized NADPH oxidase and apoplastic class III peroxidase are described.</p> <p>In chapter II, I characterized three available Arabidopsis lines homozygous for T-DNA insertions. Besides the well-studied <i>prx34-1</i>, we obtained two additional Arabidopsis <i>prx34</i> null mutants (<i>prx34-2</i>, <i>prx34-3</i>) to investigate the role of class III peroxidase PRX34 in oxidative burst and immunity in Arabidopsis. Together with the analysis of transcripts, the result indicates that PRX34 is one of the major peroxidases that constitutively accumulate in the mature leaves of Arabidopsis plants.</p> <p>In chapter III, in order to examine the role of PRX34 in the ROS generation, NaCl-solubilized cell wall proteins from the wild-type, <i>prx34-2</i> and <i>prx34-3</i> were tested for their ROS-generating activity. Remarkably, the ROS-generation requiring manganese ion (Mn^{2+}), <i>p</i>-coumaric acid (<i>p</i>-CA) and NADH as an electron donor was significantly less in the extracts of <i>prx34-2</i> and <i>prx34-3</i>, likely due to decrease in the corresponding peroxidases. Consistently, the <i>prx34-2</i> and <i>prx34-3</i> exhibited reduced accumulation both of ROS and callose in mature leaves when exposed to Flg22. Interestingly, the <i>prx34-2</i> and <i>prx34-3</i> become more susceptible to infection by virulent pathogens such as <i>Botrytis cinerea</i>, <i>Colletotrichum higginsianum</i> and <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>. These results indicate that PRX34 is a component of PTI and that is necessary for full resistance to virulent pathogens.</p> <p>In chapter IV, in contrast, ectopic expression of PRX34 under the control of 35S promoter in the wild-type caused enhanced resistance. This result is consistent with that increased expression. Especially in the overexpression line OX #8-1, the ROS burst occurred more rapidly compared to the wild-type, suggesting a role of increased PRX34 in early oxidative burst. Indeed, due to increased PRX34 expression, the OX #8-1 produced DPI-insensitive ROS compared to the wild-type.</p> <p>In this study, we evaluated the role of Arabidopsis class III PRX34 especially in terms of Flg22-elicited oxidative burst and callose formation as early (~10 min) and late (~24 hours) responses, respectively. Importantly, both <i>prx34-2</i> and <i>prx34-3</i> plants caused enhanced susceptibility to virulent pathogens, whereas ectopic expression of PRX34 improved resistance. Based on our results, it was concluded that PRX34 substantially contributes to both early and late responses during PTI. Indeed, PRX34 was shown to be upregulated upon infection or in response to elicitor such as Flg22 and chitin. Taken together, these results suggest that PRX34 is a component that positively regulates a basal resistance in Arabidopsis during both early and late responses during PTI.</p>	

論文審査結果の要旨

植物の病原体に対する防御応答の1つとして、速やかな活性酸素種（ROS）の生成（オキシダティブバースト反応）がある。この応答は、病原体の認識に続いて細胞内外の複数の産生酵素を介して誘導されると考えられている。これまでに、主要な産生酵素として細胞膜の NADPH オキシダーゼや細胞外のクラス III 型ペルオキシダーゼなどがよく調べられてきたが、特に同反応に関与するペルオキシダーゼのアイソフォームや防御応答における役割については依然不明な点が多い。これは、イネで 138 種、シロイヌナズナでは 73 種のアイソフォームが存在し、多様な発現様式に加えて相互の機能重複によって遺伝学的解析が困難なことに起因している。本論文では先ず、シロイヌナズナが有する 73 種の遺伝子のうち、病原体分子パターンの処理で発現が誘導される *PRX34* に着目し、独立した 3 系統の T-DNA 挿入変異体を用いて *PRX34* の役割について解析している。すなわち、挿入変異体のうち、プロモーター領域に T-DNA が挿入された *prx34-1* は hypermorphic mutation であり、第 1 イントロンに挿入された他の 2 系統 (*prx34-2*, *prx34-3*) は、mRNA とタンパク質の蓄積を完全に欠損した null mutation であることを確認し、続いて、これらの null 変異体では flg22 ペプチドによる ROS 生成とカロース生成が抑制され、病原細菌や糸状菌に対する罹病性が促進されることを示した。一方で、*PRX34* 遺伝子の高発現植物を 2 系統作製し、これらが flg22 誘導性の ROS 生成をより早く引き起こすこと、さらに同植物にはカロース生成の顕著な増加を伴って病原菌に対する抵抗性が付与されることなどを明らかにしている。以上から、シロイヌナズナ葉で発現している主要なペルオキシダーゼは *PRX34* であり、これが初発の ROS 生成に関与しているだけでなく、カロース生成を含む下流の防御応答を正に調節していることを明確に示した。これまで、ペルオキシダーゼのオキシダティブバースト反応への関与について示した報告は多数あるが、下流の防御応答と病原菌に対する基礎的抵抗性を関連付けて解析した例は少ない。本論文は、*PRX34* の役割について、独立した 2 つ null 変異体を使って明確にしており、その成果は学術的および応用的に高い価値を秘めている。

したがって、申請者 Lei Zhao 氏による同論文は博士（農学）の授与に相応しいと判断した。